

論文内容要旨

リポソーム化ウシラクトフェリンの経口投与は関節リウマチの進行を抑制する

主指導教員：高田 隆 教授

(基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学)

副指導教員：内田 隆 教授

(基礎生命科学部門口腔細胞生物学)

副指導教員：宮内 睦美 准教授

(基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学)

柳沢 俊良

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文内容要旨

論文題目

リポソーム化ウシラクトフェリンの経口投与は関節リウマチの進行を抑制する

学位申請者 柳沢 俊良

関節リウマチ(RA)は、全身の関節に炎症が起こり、関節の腫脹および疼痛を主訴とする自己免疫疾患である。RA が進行すると、関節の変形や機能障害を引き起こす。その RA の病態は、関節における過度の炎症と骨破壊である。そして、RA の進行には、主にマクロファージなどの炎症細胞浸潤を伴い異常に増殖した滑膜細胞いわゆるパンススから産生される TNF- α などの炎症性サイトカインが重要である。また、RAの発症には、自己に対する免疫応答を抑制する制御性T細胞(Treg)と促進するTh17 細胞(Th17)のバランスの破綻が原因である。

一方、ラクトフェリン(LF)は、唾液や母乳等に含まれる分子量が 80kDa の安全性の高い鉄結合性糖タンパク質である。LF は、抗炎症作用や免疫賦活作用、抗腫瘍作用などの多くの生物学的活性を有する。リポソーム化ウシラクトフェリン(LbLF)は、従来のウシラクトフェリン(bLF)にリポソームを付加したもので、bLF の胃での消化・分解を抑制し、小腸での吸収率を高めた糖タンパク質である。当研究室では、ラットに LbLF を経口投与し、LPS 誘導性歯周組織破壊モデルに対し、歯周組織への抗炎症効果および骨吸収抑制効果を報告した。そこで私は、歯周炎と同様の炎症性疾患ならびに骨破壊疾患である RA にも LbLF が応用できるのではないかと考え以下の実験を行った。

実験 1.6 週齢の SKG マウスを 4 群にわけ、1 群を腹腔内にマンナン(RA 誘導剤)を投与、15 週間飼育し RA 誘導群(RA 群)とした。もう 2 群は、RA を誘導する 1 週間前から濃度を違えた LbLF を 16 週にわたりそれぞれ経口投与し、LbLF100(100mg/day/kg)群、LbLF500(500mg/day/kg)群とした。最後の 1 群を RA 非誘導群(Cont 群)とした。飼育期間中脚関節の腫脹をスコアリング化(Sakaguchi 法)し、飼育 15 週間後、各群の脚組織を回収、肉眼的や CT イメージ、HE 染色および TNF- α の発現を免疫組織学的染色にて比較検討した。

実験 2.RA の進行に対する bLF の抑制メカニズムを明らかにするために、マクロファージ(THP1)や RA 患者由来滑膜細胞(RASF)を用いて TNF- α 誘導性炎症性シグナルに対する bLF の効果を in vitro の実験系で分子生物学的解析を行った。

実験 3.実験 1 と同様に 6 週齢の SKG マウスを 3 群(Cont 群,RA 群,LbLF500 群)にわけ 5 週間飼育し、自己免疫機構の破綻に対する LbLF の効果を各群の脾臓を用いて Facs 解析にて Treg と Th17 の population およびバランスを比較検討した。

実験 4.広島大学病院リウマチ・膠原病科を受診した RA 患者 20 人に対して LbLF 錠 3 か月摂取していただき、疾患活動性を評価する DAS28 や CRP、また、血清中の IL-17 や TNF- α の

別紙様式 2

サイトカイン濃度を測定し比較検討した。

その結果

実験 1. Cont 群と比較して, RA 群は, 肉眼的に脚関節の発赤・腫脹が明瞭に認められた. CT 像では, 関節骨破壊像が高度に観察された. さらに組織学的には, 関節部のパンスの形成および骨破壊が顕著に認められた. また, そのパンスおよび滑膜上皮細胞から $\text{TNF-}\alpha$ の発現が顕著に観察された. 一方, LbLF 群は, 肉眼的に関節の発赤・腫脹が軽減していた. また, CT 像では, 関節骨破壊像が抑制されていた. 組織学的にも, 関節部でのパンスの形成および骨破壊像が抑制されており, それらの所見は, 関節のスコアリングと比例していた. そして, 大変興味深いことに, 関節部パンスおよび滑膜上皮細胞の $\text{TNF-}\alpha$ の発現は, 劇的に減少していた. および, それらの結果は, 全て LbLF の濃度依存的であることが判明した.

実験 2. THP1 および RASF に bLF の前投与および $\text{TNF-}\alpha$ 刺激をすることで, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ シグナルタンパク質である P65 や $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, さらに MAPK シグナルの P38 や JNK のリン酸化が, bLF の濃度依存的に抑制されることが判明した. $\text{TNF-}\alpha$ のサイトカイン量は, RASF では有意に減少し, THP1 では減少する傾向が認められた. さらに, bLF は, アダプタープロテイン/ユビキチンリガーゼである TRAF2 に結合することが認められた.

実験 3. 脾臓の Th17 の population や細胞数は, RA 群と比較し有意に減少していた. また, Treg の population や細胞数は増加傾向を示し, Th17 と Treg の比率は, 有意に改善していた.

実験 4. 3 か月間の LbLF 錠の摂取で, 疾患活動性を評価する DAS28 や CRP は, 減少傾向を示しており, とりわけ DAS28 では, 40% の患者に moderate または good responds の反応が認められた. さらに, 血清中の $\text{TNF-}\alpha$ や IL-17 のサイトカインレベルは有意に減少していた.

本研究により, RA 誘導 SKG マウスへの LbLF 経口投与は, RA の発症に関与する Th17 と Treg のバランスを改善した. また, RA の主症状である関節の発赤・腫脹を軽減させ, 関節骨破壊を抑制し, RA の進行に関与する $\text{TNF-}\alpha$ の産生を減少させた. 一方で関節の炎症に関与するマクロファージや滑膜細胞に対する bLF の抗炎症効果が *in vitro* で確認された. さらに RA 患者の LbLF 錠の摂取で, 血清中の $\text{TNF-}\alpha$ や IL-17 のサイトカインレベルが劇的に減少するとともに RA の疾患活動性が軽減した. 以上の結果から LbLF は, RA の治療薬の可能性が示唆された.